维普资讯 http://www.cqvip.com

沈阳农业大学学报,2008-08,39(4):473-475
Journal of Shenyang Agricultural University,2008-08,39(4):473-475

# 超级稻沈农9741的组织培养体系的构建

曹 萍[1],马勇光[2],李兴涛[1],吕文彦[1],吕香玲[1],于翠梅[1*]
(1. 沈阳农业大学 农学院,沈阳 110161;2. 沈阳市农业科学院,沈阳 110034 )

**摘要**:以超级稻沈农9741的成熟胚为外植体,通过筛选基本培养基、优化激素组合和调节培养基渗透压,构建了适合水稻特定品种的高效再生体系。试验结果表明:愈伤组织诱导培养采用I3(NBB+2.0mg·L$^{-1}$ 2,4-D)培养基可获得95%的愈伤诱导率;愈伤组织继代培养采用S3 (NBB+1.5 mg·L$^{-1}$2,4-D+0.2 mg·L$^{-1}$6-BA +500 mg·L$^{-1}$脯氨酸)的培养基能使愈伤快速增殖,并且保持良好的胚性;愈伤组织分化培养采用D2(NBB+3.0 mg·L$^{-1}$ 6-BA +0.5 mg·L$^{-1}$NAA +500 mg·L$^{-1}$脯氨酸)的培养基可获得85%的幼苗分化率。该体系可用于超级稻沈农9741的遗传转化和基因工程育种研究中。

**关键词**:超级稻;成熟胚;愈伤组织;植株再生;组织培养;基因工程
**中图分类号**:Q813.1;S511 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-1700(2008)04-0473-03

# Establishment of Tissue Culture System of Super Rice Shennong 9741

CAO Ping[1], MA Yong-guang[2], LI Xin-tao[1], LÜ Wen-yan[1], LU Xiang-ling[1], YU Chui-mei[1*]
(1. College of Agronomy, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161,China;2. Shenyang Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110034, China)

**Abstract**:Using mature rice embryo from super rice Shennong 9741 as explants, a high efficient rice regeneration system suitable for special rice variety was established by selecting basic medium, optimizing the combinations of hormones and adjusting the osmotic pressures of the culture medium.Experimental results showed that the I3(NBB+2.0 mg·L$^{-1}$2,4-D) induction medium was favorable for embryogenic callus induction, with the induction rate of 95%.The S3 (NBB+1.5 mg·L$^{-1}$2,4-D+0.2 mg·L$^{-1}$6-BA +500 mg·L$^{-1}$proline) subculture medium suited for maintenance and improvement of embryogenic calli, and the highest regeneration frequency reached 85 % in D2(NBB+3.0 mg·L$^{-1}$6-BA +0.5mg·L$^{-1}$ NAA+500 mg·L$^{-1}$proline) differentiation medium. The system established in this study could be in genetic manipulation and cellular engineering for the breeding of super rice Shennong 9741.
**Key words**:rice; mature embryo; callus; plant regeneration; tissue culture; gene engineering

超级稻沈农9741是东北稻区大面积种植的一种广受人们喜欢的"口粮"品种之一[1],通过基因工程手段进一步提高其产量、品质和抗性,最终培育出新优品种将具有重大理论和实践意义。目前尚未有关于这个品种组织培养的报道。本试验以沈农9741品种为材料,探索适合的愈伤组织诱导和植株再生条件,从而建立特定品种的高效组织培养体系,为水稻转基因育种进行遗传转化的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料和培养基

试验用的超级稻品种沈农9741由沈阳农业大学水稻研究室提供。水稻组织培养中常用的基本培养基有N6,MS,B5等单一培养基及由它们的不同成分组合在一起的组合基本培养基,本试验采用的单一基本培养基:N6;组合基本培养基:NBB(N6大量元素+B5微量元素+B5有机成分),MBB(MS大量元素+B5微量元素+B5有机成分),NMB(N6大量元素+MS微量元素+B5有机成分)。关于激素的使用,本试验在愈伤组织诱导阶段添加最常用的生长素2,4-D,在愈伤组织继代及分化过程中设立生长素及细胞分裂素的不同种类及浓度的组合,具体的愈伤组织诱导、继代及分化培养基的主要成分见表1。此外各培养基同时附加7.5g·L$^{-1}$琼脂粉,30g·L$^{-1}$蔗糖,pH值均为5.8。

### 1.2 愈伤组织诱导、继代和分化培养

选取饱满沈农9741成熟种子,去壳后,用70%的乙醇消毒1min,蒸馏水中冲洗3次,然后用1.2mg·g$^{-1}$$HgCl_2$

**收稿日期**:2008-03-28
**基金项目**:辽宁省教育厅项目(20060771)
**作者简介**:曹 萍(1966-),女,沈阳农业大学实验师,从事水稻基础研究。*通讯作者 Corresponding author:于翠梅(1974-),女,沈阳农业大学副教授,博士,从事水稻转基因研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com



浸泡 10min,蒸馏水冲洗多次,取出放在带滤纸的培养皿上风干。将成熟种子接种于不同诱导培养基上诱导愈伤组织,28℃暗培养。10d 后,将愈伤组织分离并继代于不同培养基上。此后,每 10d 继代 1 次。选取生长一致、新鲜、乳白色或淡黄色、颗粒状的胚性愈伤组织接入分化培养基上,28℃,2klx,光照培养 16h·d$^{-1}$。

### 1.3 试验参数及统计学分析

试验参数:诱导率(%)=出愈的外植体块数/接种的外植体块数×100;愈伤组织生长量(g)=称重时的愈伤组织重量-接种时的愈伤组织重量;分化率(%)=分化的愈伤组织块数/接种时的愈伤组织块数×100。本研究所有试验数据均在 Excel 和 SPSS 软件上进行方差分析和显著性测验。

## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织的诱导培养

超级稻沈农 9741 成熟种子消毒后,接种于不同种类的愈伤组织诱导培养基上,1~2d 后原胚芽开始生长,7~10d 长至 3~4cm 后停止生长,在芽基部长出乳白色愈伤组织,并且不断增长,同时芽逐渐枯萎死亡。10d 后调查愈伤组织诱导率情况,试验结果表明(图 1):采用 I2 和 I3 诱导培养基,愈伤组织诱导率显著高于 I1 和 I4 培养基,而 I2 和 I3 培养基之间的诱导率差异不显著。从愈伤组织的状态看,由 I2,I3 和 I4 培养基上诱导的愈伤组织表现出颜色鲜艳,表面圆润,多呈颗粒状等胚性特征;而 I1 培养基上诱导的愈伤组织多表现出颜色黯淡,质地坚硬,毛状根较多等非胚性特征。由于试验中所设立的 I1 培养基是由单一基本培养基 N6 组成的,面 I2,I3,I4 培养基分别由 N6、MS 和 B5 的不同组分组合在一起构成的,因此试验结果说明采用组合基本培养基诱导愈伤组织的效果要优于单一基本培养基,而且由 N6 或 MS 基本培养基的大量元素与 B5 基本培养基的微量元素和有机成分的组合配置的培养基,对沈农 9741 水稻材料的愈伤组织的诱导培养效果较好。

表 1 愈伤组织诱导、继代和分化培养基成分

Table 1 Composition of medium for callus inducing,subculture and differentiation

| 培养基 Medium type | | 培养基 Medium | 激素组合/mg·L$^{-1}$ Hormone combination 2,4-D | 6-BA | NAA | 脯氨酸/mg·L$^{-1}$ Proline |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 诱导培养基 Induction medium | I1 | N6 | 2.0 | 0 | 0 | 0 |
| | I2 | MBB | 2.0 | 0 | 0 | 0 |
| | I3 | NBB | 2.0 | 0 | 0 | 0 |
| | I4 | NMB | 2.0 | 0 | 0 | 0 |
| 继代培养基 Subculture medium | S1 | NBB | 2.0 | 0 | 0 | 0 |
| | S2 | NBB | 1.5 | 0.2 | 0 | 0 |
| | S3 | NBB | 1.5 | 0.2 | 0 | 500 |
| | S4 | MBB | 1.5 | 0.2 | 0 | 500 |
| 分化培养基 Differentiation medium | D1 | NBB | 0 | 1.0 | 0.5 | 500 |
| | D2 | NBB | 0 | 3.0 | 0.5 | 500 |
| | D3 | NBB | 0 | 5.0 | 0.5 | 500 |

### 2.2 愈伤组织的继代培养

继代培养是愈伤组织快速扩增和调节质量的关键时期。本试验采用 4 种培养基继代培养,不同处理对愈伤组织生长的影响结果表明(图 2):以 S1 培养基(成分同诱导培养基 NBB)进行继代培养为对照,通过添加脯氨酸和调整激素组合的继代培养基 S2 和 S3 上的愈伤组织增殖速度显著高于对照。其中将 2,4-D 浓度由诱导时的 2.0mg·L$^{-1}$ 降低为 1.5mg·L$^{-1}$,并配合使用低浓度的细胞分裂素 6-BA(0.2mg·L$^{-1}$),使得愈伤组织的生长量明显提高,同时在继代培养基中添加 500mg·L$^{-1}$ 的脯氨酸也可以显著提高愈伤组织的生长量。而采用转换基本培养基法,即将诱导时的 NBB 基本培养基(N6 的大量无机元素)转换为 MBB 基本培养基(MS 的大量无机元

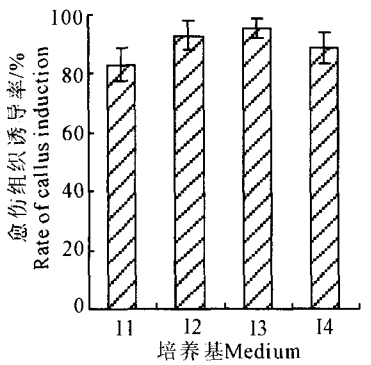


图 1 不同培养基条件下愈伤组织的诱导率

Figure 1 Induction rate of callus in different media

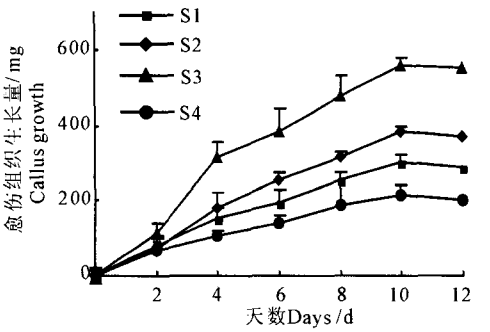


图 2 不同继代培养基对愈伤组织生长量的影响

Figure 2 Effect of different subculture media on callus growth

维普资讯 http://www.cqvip.com



素),所配置的 S4 培养基上的愈伤组织生长迟缓,增殖速度显著低于对照,并且部分愈伤组织出现非胚性特征。这说明保持愈伤组织生长过程中的大量无机元素环境的稳定性是至关重要的。

### 2.3 愈伤组织的分化培养

在 S3 培养基上继代 1 次后的胚性愈伤组织转移到 3 种分化培养基上,20d 后统计愈伤分化率结果(图 3)。由图 3 可知,在 D2 培养基上分化培养效果较好,愈伤组织分化率达 85%,而且也最早出现绿色芽点(10d 左右),15d 后出现单个或多个簇生芽,接着伸出不完全叶,相继长出完全叶。在 D1 和 D3 培养基上的愈伤分化率则较低,而且都在 15d 后才相继出现零星绿色芽点,同时部分愈伤褐化发黑死亡。这说明在愈伤组织的分化培养阶段,采用 3.0mg·L$^{-1}$ 的细胞分裂素 6-BA 和 0.5mg·L$^{-1}$ 的生长素 NAA 的激素浓度配比易于启动愈伤组织的分化,可获得较高愈伤组织分化率,有利于愈伤组织分化成苗。

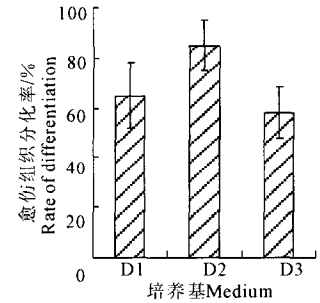


**图 3　不同分化培养基条件下愈伤组织分化率**

**Figure 3　Differentiation rate of emdryogdnie callus in different media**

## 3　结论与讨论

高效组织培养体系的建立是植物遗传转化的前提。影响水稻愈伤组织诱导和生长状态以及再生能力的因素很多,包括水稻基因型、外植体类型、培养基种类及温度和光照培养条件等[2]。目前,一系列基本培养基被用于水稻组织培养,如常规的基本培养基 MS 和 N6,以及由 MS、N6 和 B5 培养基不同成分组合而成的组合基本培养基 MBB、MMB 和 NMB 等都是经常应用的培养基,而且不同培养基适合于不同的品种[3,4]。本研究表明以 MS 或 N6 培养基的大量元素与 B5 培养基的微量元素和维生素成分组合起来配制的 NBB 和 MBB 培养基对于超级稻沈农 9741 的愈伤组织诱导效果较好。此外,有研究表明在愈伤组织诱导和继代过程中交替使用不同基本培养基类型,即转换基本培养基法,可以加速愈伤组织生长,提高愈伤组织质量[5]。但本研究采用转换基本培养基法却对愈伤组织的生长起到相反的效果。试验中愈伤组织诱导和第一次继代培养选用 NBB 培养基,在第 2 次继代时改用 MBB 培养基后,愈伤组织生长量明显下降,并出现颜色黯淡和褐化现象。这可能由于水稻品种基因型差异所致,同时也可能与转换培养基的种类和时期相关,还有待于进一步研究。

激素是培养基中的关键物质,虽用量极小,但在植物组织培养中起着重要和明显的调节作用,同时品种间对激素种类和激素浓度的需求也有很大差异[6,7]。本研究表明,在愈伤组织继代培养过程中添加 500mg·L$^{-1}$ 的脯氨酸,同时配以优化的激素组合,使愈伤组织得以快速增殖,并保持良好的胚性状态。水稻组织培养研究早期大都采用幼胚或幼穗作为外植体,比较容易获得愈伤组织,但因为幼胚或幼穗较小,操作难度大,且取材受季节限制,因此作为转基因受体,建立成熟胚诱导胚性愈伤组织再生体系则更为必要。本试验以超级稻沈农 9741 的成熟胚为外植体建立起高效的组织培养植株再生体系,可以作为遗传转化的受体系统,对超级稻种的基因工程育种及水稻功能基因组研究都将具有重要意义。

**参考文献:**

[1] 王建林,徐正进.插秧量与行距配置对北方杂交稻和常规稻产量及其构成因子的影响[J].中国水稻科学,2006,20(6):631-637.

[2] HIEI Y OHTAS,TOSHILHROK.Efficient transformation of rice mediated by *Agrobaeterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA[J].Plant,1994,6(2):271-282.

[3] HIEI Y,TOSHIHIKO K,TOMOAKI K. Transformation of rice mediated by A. *tumefaciens*[J]. Plant Mol. Biol,1997,35:205-218.

[4] 易自力,曹守云,王　力,等.提高根癌土壤杆菌转化水稻 频率的研究[J].遗传学报,2001,28(4):352-358.

[5] 刘香玲,王玉珍,罗景兰.水稻成熟胚愈伤组织的诱导和分化因素的研究[J].山东农业科学,2005,(5):7-9.

[6] BREGITZER P,DAHLEEN L S,CAMPBELL R D. Enhancement of plant regeneration from embryogenic callus of commercial barley cultivars[J].Plant Cell Rep,1998,17(12):941-945.

[7] 贝丽霞.激素对水稻悬浮细胞生长速率的影响[J].中国农学通报,1998,(2):24-27.

[责任编辑　于洪飞]